

早稲田大学大学院理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

Neuronal differentiation process of astrocyte-like progenitor cells in the postnatal hippocampus

生後海馬に存在するアストロサイト様神経前駆細胞のニューロン分化過程の解析

--

申 請 者

氏 名

難波

隆志

Takashi

Namba

専攻・研究指導
(課程内のみ)

生命理工学専攻生体制御研究

2007年 1月

「神経細胞（ニューロン）は成体脳では新生しない」というドグマがあった。しかし、近年ヒトを含めた哺乳類の海馬などの特定領域では成体期になっても例外的にニューロン新生が続いていることが確認され、このドグマは覆された。現在では「ニューロンは成体脳でも新生しうる」という新しい学説は広く認められ、この学説は基礎的な分野（記憶・学習機構の解明）からより応用的な分野（脳損傷時の再生医療や精神疾患の治療）まで大きな影響を及ぼすこととなった。例えば海馬での新生ニューロン数を増加させることにより学習能力が向上する、抗うつ薬の効果には海馬におけるニューロン新生が必要、などの結果が得られてきている。

それでは成体海馬での新生ニューロンは一体どのような性質をもつ前駆細胞から生じてきているのであろうか？近年、げっ歯類の成体海馬に存在する神経前駆細胞がアストロサイト様の性質（GFAP 陽性）を保持することが判明した。ニューロンとは別種の細胞と考えられてきたグリア細胞の一種であるアストロサイトに神経前駆細胞としての性質があることは、これまでに通念としてあった細胞系譜（グリアとニューロンの前駆細胞は別であるという二元説）に大きな疑問を投げかけるものであった。このアストロサイト様神経前駆細胞はいくつかの段階を経てニューロンへと分化すると考えられているが、その詳細なニューロン分化過程は未知のままである。詳細なニューロン分化過程を解析するためには単一細胞レベルでのニューロン分化を観察する必要がある。そのためにはアストロサイト様神経前駆細胞を培養下で生きたまま観察（live cell imaging もしくは time-lapse imaging）することが必須となってくるが、成体海馬は培養には不向きである。一方、生後初期の海馬は培養に適しているので、生後初期海馬と成体海馬で起こるニューロン新生がほぼ同一ならば生後初期海馬を成体海馬のモデルとして使用し、培養下でのニューロン新生の解析が可能になってくる。

本研究では生後初期海馬での新生ニューロンが成体海馬と同様にアストロサイト様神経前駆細胞より産生されることを明らかにした。さらに生後初期海馬に存在するアストロサイト様神経前駆細胞をトランスジェニックマウスと切片培養法を用いて生きたまま観察することに成功し、ニューロン分化過程を詳細に解析した。

まず生後初期海馬に存在する神経前駆細胞の性質とそのニューロン分化過程を *in vivo* で解析した。生後 5 日目（P5）のラット海馬に存在する分裂細胞をチミジンの類似物質であるプロモデオキシウリジン（BrdU）を用いて標識した。BrdU 投与後 30 分後では BrdU 陽性細胞の内、約 60% がアストロサイトのマーカーである S100b を発現していた。これらの BrdU/S100b 二重陽性細胞は同じくアストロサイトのマーカーである GLAST や GFAP、神経前駆細胞のマーカーである

nestin を発現していた。この結果より P5 海馬に存在する神経前駆細胞はアストロサイト様の性質を保持していることが示唆された。つづいてこれらのアストロサイト様神経前駆細胞の細胞運命を調べるために P5 ラットに BrdU を投与し、投与後 14 日目に固定した。BrdU 投与後 14 日目には BrdU 陽性細胞の内 S100b 陽性細胞は約 20%ほどとなった。一方、ニューロンのマーカーである Hu を発現している BrdU 陽性細胞の割合は BrdU 投与後 30 分後ではわずか約 6%であったが、BrdU 投与後 14 日目には約 70%に上昇した。この結果は S100b 陽性のアストロサイト様前駆細胞がニューロンへと分化したことを示唆している。また BrdU 投与後 30 分後には BrdU/S100b/Hu 三重陽性細胞などのアストロサイトのマーカーとニューロンのマーカーを同時に発現している分裂細胞も観察された。これらの細胞はアストロサイト様神経前駆細胞からニューロンへと分化する途中の段階の細胞、中間前駆細胞と推測された。

続いて我々は新生細胞の形態的な変化を詳細に解析するためにレトロウィルスベクターを用いた。レトロウィルスは分裂細胞特異的に宿主のゲノムに取り込まれるために新生細胞特異的に標識することが可能である。この実験では緑色蛍光タンパク質である EGFP を組み込んだレトロウィルスベクターを用いたので新生細胞が EGFP 陽性になり、その詳細な形態が観察可能となる。P5 のラット海馬にレトロウィルスベクターを脳定位固定装置を用いて直接注入し、3 日後と 14 日後に固定した。レトロウィルス注入後 3 日目には EGFP 陽性細胞のうち約半数が Hu を発現していた。EGFP/Hu 二重陽性細胞の大多数は双極性の細胞であり、未熟なニューロンの典型的な形態的特長を有していた。一方、EGFP の内 S100b を発現している細胞の割合は約 40%であり、その大部分が多極性の形態を有していた。レトロウィルス注入後 14 日目になると約 70%の細胞が Hu を発現し、典型的な顆粒細胞の形態をしていた。この新生ニューロンは多数の枝分かれをしたスパインを持つ樹状突起を分子層に向けて伸ばし、また多数のシナプスボタンをもつ軸索を錐体細胞層 CA3 へ向けて伸ばしていた。この結果は新生ニューロンが既存の海馬神経回路に機能的に組み込まれている事を示唆している。

以上の結果は後初期海馬においても成体海馬と同様にアストロサイト様神経前駆細胞からニューロンが新生する事を示唆している。さらにアストロサイトとニューロンのマーカーを同時に発現している中間前駆細胞を経てアストロサイト様神経前駆細胞がニューロンへと分化していることが示唆している。

次にアストロサイト様神経前駆細胞のニューロン分化過程を *in vitro* で Time-lapse imaging 法を用いて生きたまま解析した。アストロサイト様細胞を可視化するために、アストロサイトのマーカーである GFAP のプロモーター制御下で EGFP が発現するトランスジェニックマウス (GFAP α -EGFP) を用いた。まず始めに分裂直後の EGFP 陽性娘細胞の性質を調べた。分裂細胞のマーカーで

ある Ki67 を用いて免疫染色し分裂終期の核を同定した後、GFAP、Hu の発現を調べた。分裂直後の EGFP 陽性娘細胞の内、大部分が EGFP/GFAP 二重陽性細胞 (82.5%)、その他は EGFP/GFAP/Hu 三重陽性細胞 (10.0%)、EGFP/Hu 二重陽性細胞 (7.5%) であった。次にこれら分裂直後の EGFP 陽性娘細胞の細胞運命を切片培養法と Time-lapse imaging 法を用いて追跡した。P4 から P9 の GFAP⁺ - EGFP トランスジェニックマウスより海馬切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて個々の EGFP 陽性娘細胞を観察した。EGFP 陽性細胞の細胞運命を、分裂後 0-10hr に固定した群と分裂後 12hr 以降に固定した群の二群に分類して解析を行った。分裂後 0-10hr では EGFP 陽性娘細胞の内、73.8%が EGFP/GFAP 二重陽性細胞、19.0%が EGFP/GFAP/Hu 三重陽性細胞であった。分裂後 12hr 以降では EGFP/GFAP 二重陽性細胞の割合は 0-10hr と比較して減少し (55.8%)、EGFP/GFAP/Hu 三重陽性細胞の割合は上昇した (36.5%)。この結果は EGFP/GFAP 二重陽性のアストロサイト様神経前駆細胞が EGFP/GFAP/Hu 三重陽性の中間前駆細胞へと分化していったことを示している。さらに、アストロサイト様神経前駆細胞が対称分裂もしくは非対称分裂のどちらを行ってニューロンへと分化するのかを解析するために、分裂後の娘細胞ペアの細胞運命を調べた。分裂後 0-10hr では EGFP 陽性娘細胞ペアの内、66.7%が対称的に GFAP を発現している娘細胞ペア、9.5%が対称的に GFAP/Hu を発現している娘細胞ペアであったが分裂後 12hr 以降では対称的に GFAP を発現している娘細胞ペアの割合は 0-10hr と比較して減少し (46.2%)、対称的に GFAP/Hu を発現している娘細胞ペアの割合は増加した (34.6%)。この結果はアストロサイト様細胞が主に対称分裂を行ってニューロンへと分化している事を示している。一方でごく少数ながら非対称な EGFP/GFAP 二重陽性娘細胞と EGFP/GFAP/Hu 三重陽性娘細胞のペアも確認された。この結果はアストロサイト様神経前駆細胞からのニューロン新生の直接的な証拠でもある。

上記の *in vivo* と *in vitro* (Time-lapse imaging) の結果より、生後海馬に存在するアストロサイト様神経前駆細胞がニューロンへと分化することが直接的に示された。また、そのニューロン分化過程は主に対称分裂に因るが、一部は非対称分裂を行っていることが判明した。さらにアストロサイト様神経前駆細胞は非対称分裂により自己複製を行っていることが示唆された。

本研究により生後脳に存在する神経前駆細胞の詳細なニューロン分化過程が明らかとなった。本研究は中枢神経系の再生医療などを旨とする応用研究の為の重要な基礎データを提供するであろう。

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>新しいものから古いものへ順番にしてください。</p> <p>Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Namiki H, Seki T. Postnatal neurogenesis in hippocampal slice cultures: early <i>in vitro</i> labeling of neuronal precursor cells leads to efficient neuronal production. <i>J Neurosci Res</i>. In press.</p> <p>Seki T, Namba T, Mochizuki H, Onodera M. Clustering, migration and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus. <i>J Comp Neurol</i>. In press.</p> <p>Liu J, Suzuki T, Seki T, Namba T, Tanimura A, Arai H. Effects of repeated phencyclidine administration on adult hippocampal neurogenesis in the rat. <i>Synapse</i>. 60(1):56-68, 2006.</p> <p>Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Mizuno Y, Namiki H, Seki T. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. <i>Eur J Neurosci</i>. 22(8):1928-41, 2005.</p> <p>Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. <i>Neuron</i>. 47(6):803-15, 2005.</p> <p>Yamaguchi M, Suzuki T, Seki T, Namba T, Liu J, Arai H, Hori T, Shiga T. Decreased cell proliferation in the dentate gyrus of rats after repeated administration of cocaine. <i>Synapse</i>. 58(2):63-71, 2005.</p> <p>Yamaguchi M, Suzuki T, Seki T, Namba T, Juan R, Arai H, Hori T, Asada T. Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. <i>Ann N Y Acad Sci</i>. 1025:351-62, 2004.</p>
総説	なし
講演	<p>難波隆志、並木秀男、石龍徳．生後海馬で起こる神経細胞新生の Time-lapse imaging法を用いた解析．平成 18 年度神経発生討論会，岡崎，（2006 年 12 月）</p> <p>Seki T, Namba T, Mochizuki H. Clustering, migration and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus. Soc Neurosci, 517.10, Atlanta, USA, (Oct. 2006).</p> <p>Namba T, Namiki H, Seki T. New migration pattern in the postnatal neurogenesis of the dentate gyrus. NEUROSCIENCE RESEARCH 55: S242-S242 Suppl. 1, (2006)</p>

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 （ 続 き ）	<p>難波隆志、並木秀男、石龍徳. Developmental process of granule cells in the hippocampus. 神経組織の成長・再生・移植研究会 第 21 回学術集会, P12, 東京, (2006 年 5 月).</p> <p>石龍徳、難波隆志. 成体海馬のニューロン新生:ニューロブラストの移動と突起形成. 第 111 回日本解剖学会総会, P15-08, 神奈川, (2006 年 3 月).</p> <p>難波隆志、並木秀男、石龍徳. 海馬切片培養法を用いたニューロン新生の解析. 第 111 回日本解剖学会総会, P15-08, 神奈川, (2006 年 3 月).</p> <p>Namba T, Namiki H, Seki T. Neurogenesis in hippocampal slice cultures. 第 28 回日本神経科学大会, P1-173, 横浜, (2005 年 7 月).</p> <p>Tozuka Y, Fukuda S, Seki T, Namba T, Hisatsune T. Neurogenesis in hippocampal slice cultures. 第 28 回日本神経科学大会, P1-174, 横浜, (2005 年 7 月).</p> <p>Namba T, Namiki H, Seki T. Nature, migration and fate of hilar proliferating cells in the postnatal rat dentate gyrus. Soc Neurosci, 31.20, SanDiego, USA, (Nov. 2004).</p> <p>Namba T, Namiki H, Seki T. Nature, cell-cell interaction and fate of hilar proliferating cells in the postnatal rat dentate gyrus. 生理研カンファレンス・未来開拓シンポジウム“Adult neurogenesis in normal and pathological conditions”, P1, 岡崎, (2004 年 11 月).</p> <p>Namba T, Namiki H, Seki T. Nature, migration and fate of hilar proliferating cells in the postnatal rat dentate gyrus. 第 27 回日本神経科学大会, 31.20, 大阪, (2004 年 9 月).</p> <p>Namba T, Namiki H, Seki T. Development of newly generated cells into granule cells in the postnatal rat hippocampus. 第 26 回日本神経科学大会, S124, 名古屋, (2003 年 7 月).</p> <p>難波隆志、並木秀男、石龍徳. 生後の海馬歯状回でおこるニューロン新生の解析. 第 55 回日本動物学会関東支部大会, P48, 東京, (2003 年 3 月).</p> <p>難波隆志、石龍徳. 海馬切片培養における神経細胞新生の解析. 第 54 回日本動物学会関東支部大会, P20, 東京, (2002 年 3 月).</p>
著書	なし
その他	なし

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）